



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The Chara plasma membrane system : an ancestral model for plasma membrane transport in plant cells

Zhang, S.

Citation

Zhang, S. (2018, May 9). *The Chara plasma membrane system : an ancestral model for plasma membrane transport in plant cells*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/64136>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/64136>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:

<http://hdl.handle.net/1887/64136>

Author: Zhang, S.

Title: The Chara plasma membrane system : an ancestral model for plasma membrane transport in plant cells

Issue Date: 2018-05-09

Samenvatting

De multi-cellulaire zeer grote Chara algensoorten zijn al decennia op grote schaal gebruikt in fysiologische onderzoeken. Dankzij de enorme celgrootte en het gemakkelijk toegankelijke en goed te controleren celmembraansysteem richtte het onderzoek aan deze cellen zich vooral op ionen transport, cytoplasmastroming, hormoontransport, cellulaire organisatie, enzovoort. Met de snelle vooruitgang in bio-informatica en moleculaire biologie, is de noodzaak om ook het Chara modelsysteem aan te vullen met meer gedetailleerde studies op moleculair niveau duidelijk.

In ons onderzoek zijn we begonnen met de fysiologische verschijnselen die zijn geassocieerd met de rol van het planten hormoon auxine te koppelen aan moleculaire mechanismen, waardoor een meer geavanceerd en uitgebreid gebruik van Chara als modelsysteem inzichtelijk wordt.

Hoofdstuk 1 bespreekt enkele van de opmerkelijke kenmerken van Chara binnen de focus van celbiologie en elektrofysiologische studies. Een model wordt voorgesteld voor het mogelijke mechanisme achter het fenomeen Chara pHbandvorming. Twee sleutelementen, auxine en plasmamembraan (PM) H^+ -ATPasen worden benadrukt met betrekking tot hun bekende functies in de hogere landplant-modelsystemen.

Om Chara te kunnen exploiteren als een onderzoeksmodel dat verder gaat dan de klassieke fysiologische studies, is een duurzame en gestandaardiseerde Chara-cultuur niet alleen handig, maar ook noodzakelijk. In **hoofdstuk 2** worden de ervaringen en lessen uit de Chara-laboratoriumkweekexperimenten benoemd en besproken. Hoewel de kweek van Chara in een laboratoriumomgeving over het algemeen goedkoop is en niet veel speciale zorg behoeft, is de cultuur als geheel met betrouwbare productie van voldoende gezond celmateriaal vrij fragiel. Een kleine verstoring of verandering van het milieu kan ernstige schade aan het hele kweekstelsel veroorzaken. Om een gezonde, langdurige Chara-laboratoriumkweek tot stand te brengen, bleek een hoge aanvangsdichtheid vereist. De juiste combinatie van bodem, licht en temperatuur is cruciaal voor de dominantie van Chara tegen de secundaire algen/ schimmels/ bacteriën. In onze experimenten zien we dat een lage nutriënten concentratie, een lage lichtintensiteit en een relatief lage temperatuur het overgroeien van ongewenste

plankton en cyanobacteriën voldoende kunnen verminderen. Naast de basale groei condities, is hygiëne altijd belangrijk bij het omgaan met de kweek.

In **Hoofdstuk 3** worden de bekende rol en effecten van auxine in het functioneren en membraan transport in algencellen bijeen gebracht en geanalyseerd in vergelijking met de rol en effecten van auxine in hogere planten. Twee parallelle modellen gebaseerd op Arabidopsis en Chara werden gebouwd om de overeenkomsten en verschillen te benadrukken. Hieruit blijkt dat Chara-cellen bepaalde eigenschappen hebben om een goed modelsysteem voor auxineonderzoek te bieden. Het hoofdstuk benoemt de onbekende aspecten die volgen uit de bestaande kennis wijst op nieuwe onderzoeksrichtingen.

In **Hoofdstuk 4** worden de effecten en mogelijke rol van auxine in Chara-cellen beschreven. De membraanpotentiaal en ionenfluxen (in het bijzonder van K^+ en H^+) van intacte Chara-internodale cellen werden gemeten in reactie op verschillende stimuli, b.v. licht, zout, auxine en pH. Door de niet-invasieve ion-selectieve vibratieprobe-scanningelektrodeteknik kan het pH-bandpatroon van Chara-intermodale cellen worden gevolgd, evenals de real time K^+ en H^+ ionenfluxen die reageren op de verandering van licht- en ionensamenstelling van de extracellulaire vloeistof. De resultaten tonen de fysiologische reacties van Chara-cellen op de toediening van extracellulaire auxine (voornamelijk IAA) stimulerend, zoals het optreden van een hyperpolarisatie van de membraanpotentiaal. Onderzoek van K^+ en H^+ ionenstromen afzonderlijk laat zien dat vergeleken met K^+ fluxen er geen opmerkelijke invloed is op H^+ fluxen door de toevoeging van IAA. De combinatie van gegevens geeft aan dat, in tegenstelling tot wat bekend is van landplanten, auxine de permeabiliteit en/of kanaalactiviteit voor K^+ van de Chara-plasmamembraan kan veranderen, maar dat het geen sterk effect heeft op Chara PM H^+ -ATPasen.

Hoofdstuk 5 is gericht op de verschillen in relatie tussen auxine en de Chara PM H^+ -ATPasen in vergelijking met hogere plant H^+ -ATPasen. , Om de mogelijke verschillen tussen Chara PM H^+ -ATPasen en andere goed bestudeerde PM H^+ -ATPasen van hogere planten te onderzoeken werd een mogelijk Chara PM H^+ -ATPase-gen (CHA1) werd geïsoleerd, de sequentie ervan bepaald en geanalyseerd. Een bio-informatica analyse toonde een nieuw patroon in het evolutionaire perspectief tussen algen en landplanten. Heterologe expressie van CHA1 in gist en plantenprotoplasten bevestigde dat CHA1 de plasmamembraan

kan bereiken en kan functioneren als een PM H^+ -ATPase met een auto-inhiberend domein op de C-terminus. Het regelmechanisme van CHA1 lijkt anders te zijn dan dat van de bekende PM H^+ -ATPasen van planten, omdat ze waarschijnlijk niet de betrokkenheid van een 14-3-3-eiwitcombinatie nodig hebben. Het in het proefschrift beschreven onderzoek illustreert dat, hoewel het pH-verschil tussen/ langs het Chara-celmembraan het auxinetransport en de distributie kan beïnvloeden, auxine zelf geen directe effecten op de activiteit van Chara PM H^+ -ATPasen vertoont. Het Chara plasmamembraantransport onder verschillende omstandigheden werd bestudeerd, met nadruk op de PM H^+ -ATPase, als een belangrijke speler in het membraantransportsysteem. De PM H^+ -ATPase wordt ook op moleculair niveau onderzocht. Bio-informatica en functionele analyse van de geïsoleerde Chara PM H^+ -ATPase onthullen een nieuw aminozuurpatroon dat essentieel zou kunnen zijn voor structurele stabilisatie, ATP-hydrolyse en protontransport. Daarnaast wordt een mogelijk ander regulatiemechanisme zichtbaar in vergelijking met de bekende plant en gist PM H^+ -ATPasen. Dit kan een nieuw lichtwerpen op de PM H^+ -ATPase-onderzoeken binnen de algengroep vanuit het evolutionaire perspectief. Door realisatie van een standaardlaboratoriumcultuur en nieuwe vooruitgang op moleculair niveau, zullen de Chara-cellen een vernieuwd veelbelovend platform bieden voor verschillende fundamentele en praktische studies.

